

Untersuchungen zur nicht EDTA-hemmbaren
(= EDTA-stabilen) Serum-Paraoxonase bei Finnen

von
Friedrich Brensing
aus
Bad Kissingen

*Diss. Kelangen
1984*

1984 W 301



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0090

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

Untersuchungen zur nicht EDTA-hemmbar
(= EDTA-stabilen) Serum-Paraoxonase bei Finnen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Friedrich Brensing
aus
Bad Kissingen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.1984

Inhaltsverzeichnis

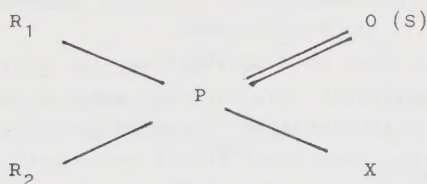
- I. Einleitung
 - 1. die insektiziden Organophosphate
insbesondere Parathion und Paraoxon
 - 2. Abriß der Untersuchungen zur Paraoxonase
insbesondere zur Hemmung der Paraoxonase
- II. Problemstellung
- III. Beschreibung des Kollektivs
- IV. Rassen- und völkerkundliche Anmerkungen
- V. Eigene Untersuchungen
 - 1. Gewinnung und Aufbewahrung der Seren
 - 2. Methodik
 - 3. Berechnung
- VI. Ergebnisse
- VII. Statistische Auswertung
- VIII. Diskussion
- IX. Zusammenfassung
- X. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

1. Kurzer Abriß über die insektiziden Organophosphate, insbesondere Parathion und Paraoxon

Die insektiziden Organophosphate haben ihre Bedeutung nicht eingebüßt, zumal der Anwendung der chlorierten cyclischen Kohlenwasserstoffe (DDT u. verwandte Substanzen) weltweit Restriktionen auferlegt wurden. Die Substanzgruppe der Organophosphate umfaßt heute mehr als 50 Verbindungen. Eine systematische Bearbeitung erfolgte durch G. Schrader, der eine allgemeine Formel aufstellte (Abb. 1).

Abb. 1 "Schrader-Formel" für insektizide Organophosphate



R_1 = Alkoxy-

R_2 = Alkoxy-, Alkyl-,
Dialkylamido-

als bas. Gruppen

X = Halogen-, Cyanid-,

Phenoxy-, disubst. Pyrophosphat- als acide Gruppen

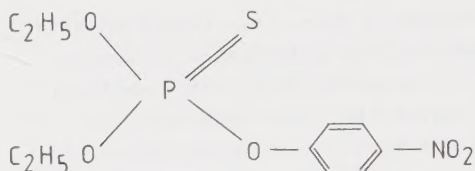
Ihre Wirkung entfalten die Alkylphosphate als Atem-, Fraß- und aufgrund guter Lipoidlöslichkeit als Kontaktgifte.

Daraus leiten sich die Möglichkeiten und Wege der Intoxikation für den menschlichen Organismus ab.



Als Bezugssubstanz für die Toxizität gilt E 605 (= Parathion oder 0,0 - Diäthyl - 0 - (p-nitrophenyl) - thiophosphat)

Abb. 2: Formel für Parathion

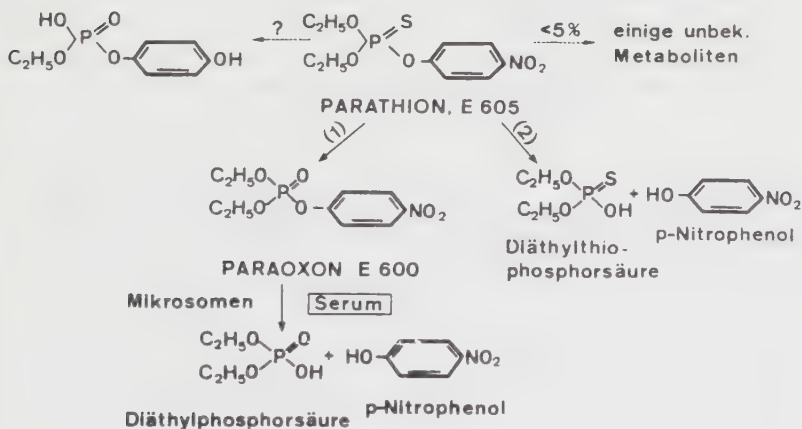


Grundlegende Arbeiten zum Metabolismus des Parathions im Warmblüterorganismus stammen von Neal (1971) sowie Poor und Neal (1972). Der wesentliche Schritt verläuft dabei als "Giftung":

Parathion wird zu Paraoxon (0,0 -Diäthyl -0- (p - nitrophenyl) - phosphat) oxidiert. Das Paraoxon wird im Serum nun hydrolysiert zu Diäthylphosphorsäure und p - Nitrophenol. Ein weiterer Stoffwechselweg führt direkt vom Parathion durch Hydrolyse zu Diäthylthiophosphorsäure und p - Nitrophenol. Den Stoffwechsel von Parathion im Warmblüterorganismus stellt Abb. 3 dar.

Abb. 3

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Die toxische Wirkung der Organophosphate beruht auf der Hemmung der Cholinesterase.

Der elektrophile Phosphorylrest reagiert mit den nukleophilen funktionellen Hydroxylgruppen eines Serinrestes im katalytischen Zentrum der Esterasen. Da die Abspaltung des Phosphorylrestes sehr langsam geschieht, muß der Großteil des Enzyms durch Neusynthese ersetzt werden (irreversible Hemmung).

Die resultierenden Vergiftungserscheinungen, die somit auf eine endogene Acetylcholinvergiftung zurückzuführen sind, werden charakterisiert als muskarinartig, ausgehend von den parasympathischen Nervenendigungen, und als nikotinartig, ausgehend von vegetativen Ganglien und der motorischen Endplatte. Entsprechende Vergiftungserscheinungen werden bei einer Aktivitätsminderung der Cholinesterase um 75 % beobachtet.

2. Abriß der Untersuchungen zur Paraoxonase, insbesondere zur Hemmung der Paraoxonase

Paraoxon als eigentlich toxisches Agens unterliegt im Organismus einem enzymatischen Abbau, erstmals beschrieben von Mazur (1946) als Hydrolyse der Säureanhydridbindung von Anticholinesterasen des Organophosphat-Typs. Aldrige (1953 b) ordnete diese hydrolytische Aktivität der sog. A-Esterase des Warmblüters zu, die aromatische Ester wie z. B. p-Nitrophenylacetat zu spalten vermag. Seither wurde der Begriff "Paraoxonase" eingeführt. Main (1960 a, b) allerdings wies nach, daß gereinigte Paraoxonase aus Schafserum zwar Paraoxon aber nicht Phenylacetat hydrolysiert.

In einer Arbeit über die enzymatische Hydrolyse von E 600 (= Paraoxon) durch menschliches Serum beschrieb Krisch (1968) die "menschliche Serumparaoxonase" durch folgende Charakteristika:

- Michaeliskonstante K_M zwischen 2,5 und $5,7 \times 10^{-4}$
- pH-Optimum zwischen 11,0 und 11,6
- Hemmbarkeit durch Chelatbildner, insbesondere durch EDTA

Im pH-Optimum von 11,2 fand er Enzymaktivitäten, die sich von Proband zu Proband unterschieden.

Sein Kollektiv von 50 Probanden zeigte je eine Gruppe höherer und niedriger Aktivität mit teilweiser Überlappung. Den Grund für diese Gruppierung vermutete er in einer genetischen Determination. Gleichzeitig gab Krisch (1968) ein Verfahren an, die Paraoxonaseaktivität anhand der photometrischen Messung von p-Nitrophenol im enzymkinetischen Ansatz zu bestimmen. Mit der sog. Anticholinesterasetechnik ermittelten Geldmacher v. Mallinckrodt et al. (1969) nach der in-vitro-Vergiftung menschlichen Serums mit Paraoxon drei Gruppen von verbleibenden Cholinesteraseaktivitäten: Je eine mit niedrigen, mittleren und hohen Werten.

In einer Untersuchung, die beide Verfahren kombinierte, konnten Geldmacher-v. Mallinckrodt et al (1972) dies auf eine entsprechende Verteilung der Paraoxonaseaktivitäten zurückführen. Diesen Polymorphismus der Paraoxonaseaktivität wiesen Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1973 b) nach an 35 Familien mit 52 Kindern und nahmen an, daß er mit einem 2-Allele-Modell zu erklären sei. Zech und Zürcher (1974) sowie Dumbach (1976) stützten diese Annahme; Playfer et al. (1976) kamen für ein britisches und indisches Kollektiv ebenfalls zu der Anschauung des 2-Allele-Modells; die Ergebnisse aus Untersuchungen an Malaien, Nigerianern, Chinesen und Kenianern waren damit jedoch nicht zu erklären.

An einem großen westdeutschen Kollektiv zeigten Geldmacher-v.Mallinckrodt et al. (1979) mittels der Anticholinesterasetechnik die Gruppierung der Paraoxonaseaktivitäten im Sinne einer Trimodalität um niedrige, mittlere und höhere Werte im Verhältnis von 57,9 : 36,1 : 6.

In diesem Zusammenhang durchgeführte Familienstudien bestätigten das 2-Allele-Modell.

Untersuchungen von Omuro (1980) an Japanern, von Hieronymus (1980) an Vietnamesen wie die von Playfer (1976) an Nigerianern, Kenianern, Malaien und Chinesen setzten hinsichtlich der genetischen Determination mindestens ein weiteres Allel voraus. Die Phänotypie der Paraoxonaseaktivität als Rassenmerkmal zu erweisen ist Ziel weiterer gegenwärtig laufender Untersuchungen.

Hemmung der Paraoxonspaltung

Eine Hemmung der Arylesterasen durch Zusatz von EDTA ohne Beeinflussung der Cholinesterasen beobachteten Erdös, Debay und Westermann (1959). Mit einer EDTA Konzentration von 5×10^{-5} hemmten Marton und Kalow (1960) ein der Paraoxonase offensichtlich entsprechendes Enzym im menschlichen Serum vollständig.

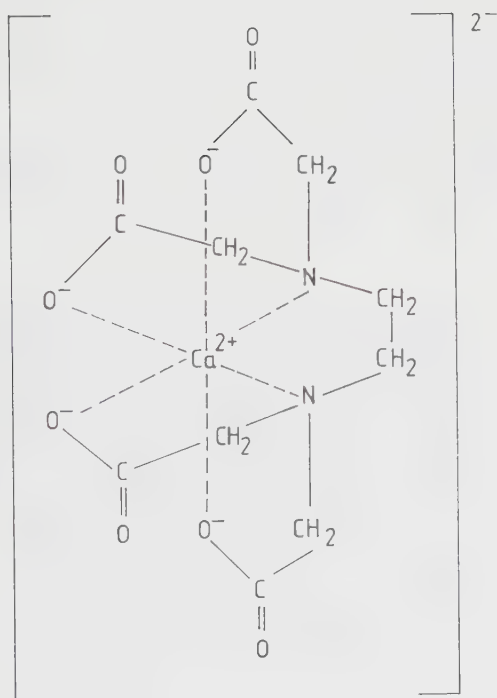
Unterschiedlich hohe verbleibende Aktivitäten der Arylesterase nach Hemmung durch EDTA-Zusatz ermittelten Erdös und Boggs (1961) in den Serumfraktionen IV - 1 und V. Während die Aktivität der Fraktion V durch EDTA nicht gehemmt wurde und somit den ursprünglichen Wert aufwies, war in der Fraktion IV - 1 keinerlei verbleibende Aktivität nachzuweisen.

Krisch (1968) führte außer EDTA noch weitere Inhibitoren an: Diisopropylfluorophosphat, Physostigmin, Chinin-HCl, Atoxyl, Natriumfluorid, p-Chloromercuribenzoat, Bathocupreindisulfonsäure, o-Phenanthrolin, 8-Hydroxy-Chinolin.

Die mit einer Konzentration von 10^{-4} M EDTA erzielte Hemmung gab er mit 47 % der Ausgangsaktivität an (53 % Restaktivität). Auch schilderte er eine Aktivitätssteigerung durch Ca^{2+} , so daß der Schluß auf eine Funktion von EDTA als Ca-Fänger nahelag.

EDTA (=Äthylendiamintetraessigsäure) vermag im alkalischen Medium mit Ca^{2+} -Ionen Chelatkomplexe zu bilden im Verhältnis von 1 : 1 unter Freisetzung von 2H^+ -Ionen (Abb. 4).

Abb.4 EDTA-Chelat-Komplex mit Ca^{2+}



Die verbleibende Aktivität im Serum in Bezug zu setzen zur Konzentration der zugefügten EDTA im Ansatz nach Krisch war Gegenstand einer Arbeit von Hechtel (1980). Bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M bewirkte in allen geprüften Seren eine Konzentrationssteigerung eine Verringerung der verbleibenden Esteraseaktivität. Eine Konzentrationssteigerung über 10^{-3} M EDTA hinaus führte jedoch zu keiner weiteren Hemmung der gemessenen Restaktivitäten zwischen 20 und 45 U/l. Die durch entsprechende Auswahl der Probanden angelegte deutliche Trimodalität der Ausgangsaktivität war aufgehoben. Omuro (1980) und Hieronymus (1980) sahen, unabhängig von der Verteilung der Ausgangsaktivität, eine angenäherte Normalverteilung der Restaktivitäten nach Zusatz von EDTA (10^{-3} M).

II. Problemstellung

Vorliegende Arbeit soll an einem ersteren finnischen Kollektiv (n=99) die nicht EDTA-hemmbar Aktivität der Paraoxonase untersuchen. Das Kollektiv wurde dazu nach Frauen und Männern getrennt betrachtet. Weiter war die Frage einer Abhängigkeit von Alter und Geschlecht zu prüfen. Ein weiteres zweites Kollektiv (n=54), dessen Seren etwa 20 Monate bei -22° C gelagert waren, wurde unter denselben Gesichtspunkten bearbeitet. In Anknüpfung an Omuro (1980), Lindorf (1971) und Koller (1983) sollten evtl. Auswirkungen der Lagerung beachtet werden. Darüberhinaus sollte geklärt werden, ob die nicht EDTA-hemmbar Aktivitäten einer Abhängigkeit von den Ausgangsaktivitäten unterliegen, die Koller (1983) für das gleiche finnische Kollektiv ermittelt hatte.

III. Beschreibung des Kollektivs

99 Seren stammen von Angestellten des anatomischen und physiologischen Instituts der Universität Oulu, allesamt finnische Staatsbürger. Verwandtschaftsverhältnisse lagen nicht vor. Die Probanden, 67 Frauen und 32 Männer zwischen 18 und 57 Jahren, waren nach eigenen Angaben und klinischem Aspekt gesund. Weitere 54 Seren wurden uns zur Verfügung gestellt. Sie stammen von Blutspendern unter den Einwohnern der Orte Ruuki, Rantsilla und Haukipudas.

Diese Orte liegen im Umkreis von Oulu. Manifeste Erkrankungen der Probanden wurden nicht berichtet; Verwandtschaftsverhältnisse waren nicht zu erkennen; es handelt sich um 25 Frauen und 29 Männer.

IV. Rassen und völkerkundliche Anmerkungen

Nach Bernatzki (1954) sind Funde vom nördlichen Eismeer und von Südfinnland aus dem 7. und 8. Jahrtausend v. Chr. die ältesten Zeugnisse einer Besiedelung. Um 3000 v. Chr. breitete sich in Finnland eine neue Steinzeitkultur aus; diese Kultur der Kammkeramik ist archäologisch definiert als Auftreten neuer keramischer Techniken. Unentschieden ist die Frage, ob diese neue Kultur durch Beeinflussung von außen oder durch Verdrängung der ansässigen Bevölkerung entstand. Anthropologischen Feststellungen zufolge gehörten die Kammkeramiker zu einer langschädelligen Rasse, der kurzschädellige mongolide Elemente beigemischt waren.

Abgelöst wurde die Epoche der Kammkeramik von der Schnurkeramik (auch "Bootstichkultur") deren Zentrum in Mitteleuropa lag und die offenbar in Verbindung steht mit indogermanischen Wanderbewegungen. Die Schnurkeramiker trugen Merkmale einer langschädelligen europiden Rasse, die über das Baltikum einwanderte. Schnur- und Kammkeramik verschmolzen in der sog. Kiukainen-Kultur (1600 - 1200 v. Chr.). Die Finnen im heutigen Sinne drangen in den letzten vorchristlichen Jahrhunderten von der Südküste des finnischen Meerbusens vor, einem Gebiet, das heute bewohnt wird von den Esten, die ebenfalls zur finnischen Völkergruppe gerechnet werden. Finnen (=fenni) finden erstmals Erwähnung in der "Germania" des Tacitus und bei Ptolemäus. Deren Beschreibung meint aber eher die Lappen, die der Gote Jordanes (6. Jahrhundert nach Chr.) dann als Skridfinnen (= Schreitfinnen) bezeichnet.

Die Einwanderbewegung dauerte bis ins 4. Jahrhundert nach Chr.; die eingewanderten Völker übernahmen skandinavische Kulturanteile und entwickelten sich zu einer selbständigen Einheit, weitgehend unabhängig vom estnischen Ausgangsgebiet. Geht die Sprachwissenschaft noch von der "finno-ugrischen" Sprachgruppe aus, einer Einheit, der sie ein Urvolk an der mittleren Wolga zuordnet (Bernatzki 1954), glaubt die Ethnologie nur eine Verwandtschaft zwischen finnischen und estnischen Volksgruppen zu erkennen. Es ist darüber hinaus anzumerken, daß das Finnische dem Ungarischen im gleichen Maße ähnelt, wie etwa das Deutsche dem Persischen im Rahmen der indogermanischen Sprachverwandtschaft. Finnen und Esten werden heute als ostbaltische Rasse beschrieben:

Nähezu kurzschädelig und von mittlerem Wuchs.
Skandinavische Typen weist der Norden Finnlands auf.

Eickstedt (1934) meint in dem vorhistorischen Volksstamm der Tschuden die Urfinnen zu erkennen. Diese gehörten zu den Westsibiriden, die er als sog. Zwischenrasse ansiedelt unter "tungiden", "turaniden" und "mongoliden" Elementen, die dennoch europide "nordische" Züge aufweisen.

Die Finnen der Jetztzeit gruppiert er unter die Träger osteuropäischer Merkmale, an denen er wiederum gewisse mongolide Züge ausmachen zu können glaubt. Jene "Mongolidismen" seien entstanden im Aufeinandertreffen verschiedenartiger "Großrassen", aus denen sich die heutigen Rassen differenziert hätten.

Bernatzki (1954) legt den Ursprung der heutigen Finnen ins mittlere und östliche Rußland. Finne sei ursprünglich die Bezeichnung gewesen, die von den Germanen in Skandinavien und östlich davon lebenden nichtgermanischen Stämmen gegeben wurde.

Die "Finnen" (Suomi) seien aus Estland (s.o.) eingewandert. Als weitere Angehörige der finnisch-estnischen Völkerfamilie nennt er die Esten, die Waldfinnen Norwegens und Schwedens (die größtenteils in der dortigen Bevölkerung aufgingen), die Ingermanländer oder Leningrader Finnen, die Liven, die Mordwinen, die Ischermischen a. d. Wolga und weitere Stämme, die in der Region von Archangelsk ansässig sind.

Im Laufe der Geschichte geriet Finnland zunächst unter schwedische Herrschaft, bis es dann im Frieden von Fredrikshamn (1807) an Rußland abgetreten wurde. Ein selbständiges finnisches Staatsgebilde gibt es erst seit 1917.

Oulu (schwed. Uleaborg) liegt etwa 120 km von der finnisch-schwedischen Grenze entfernt. Der alte Stadtkern macht auch heute noch den schwedischen Einfluß deutlich. Früher galt es als bedeutendster Teerexporthafen der Welt; heute ist es mit ca. 90.000 Einwohnern moderne Hafen- und Industriestadt und Sitz einer Universität.

Haukipudas liegt ca. 20 km nördlich von Oulu am Meer, Rantsilla und Ruuki ca. 40 km südlich bzw. südöstlich. Es sind dies kleinere Orte von etwa tausend Einwohnern (siehe Karte).



V. Eigene Untersuchungen

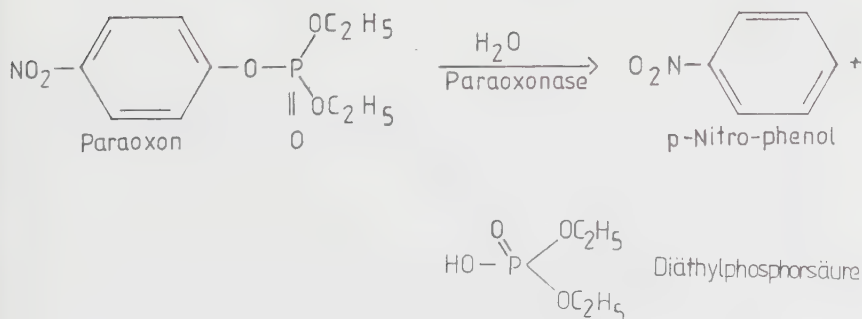
1. Gewinnung und Aufbewahrung der Seren

Die Blutproben wurden an ersterem Kollektiv (n=99) aus einer Armvene mittels einer Monovette entnommen; nach Eintritt der Gerinnung wurde das Serum abzentrifugiert und sofort tiefgefroren. Der Transport nach Deutschland erfolgte in ca. vierstündigem Flug in einer Kühlbox. Bis zur Aufarbeitung nach 6 Wochen waren die Seren tiefgefroren aufbewahrt. In der gleichen Weise wurde mit den Seren des zweiten Kollektivs (n=54) verfahren, die bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung ca. 20 Monate alt waren.

2. Methodik

Es gelangte das von Krisch (1968) beschriebene Verfahren zur Anwendung, das, wie bereits erwähnt, auf der photometrischen Messung des bei der Hydrolyse von Paraoxon freigesetzten p-Nitrophenols beruht (siehe Abb. 5).

Abb. 5 Hydrolyse von Paraoxon durch die "Paraoxonase"



Die Menge des anfallenden p-Nitrophenols ist ein direkter Parameter für die enzymatische hydrolytische Aktivität, die unter den Bedingungen der Hemmung mit EDTA in einer 10^{-3} m Konzentration im Meßansatz auftritt und somit ein Parameter für die nicht EDTA-hemmbarere Serumpaeroxonase.

Verwendete Lösungen

1. 0,1 m Glycin - NaOH-Puffer, pH = 11,2
mit EDTA in einer Konzentration von 1×10^{-3} m.
2. E 600 Stammlösung ($1,2 \times 10^{-2}$ M in 0,1 m Trispuffer, pH = 8,0)
3. E 600 Gebrauchslösung
4. 0,9 %ige NaCl-Lösung
5. verdünntes Serum

Herstellung von Lösungen

Glycin - NaOH - Puffer (mit EDTA in einer Konzentration 1×10^{-3})

7,507 g Glycin in 900 ml aqua dest lösen, nach Zufügen von 292 mg EDTA einstellen auf pH 11,2 mit 35 %iger NaOH
Kontrolle durch pH-Meter
Auffüllen des Puffers auf 1000 ml

Tris-Puffer

12,114 g Tris in 900 ml aqua dest gelöst, einstellen auf pH = 8 durch Zusatz von 0,1 n HCl (pH-Meter-Kontrolle)
Auffüllen des Puffers auf 1000 ml.

E 600 Stammlösung

0,26 ml E 600 in 100 ml Tris-Puffer gelöst, etwa 10 min.
im Schliffkolben schütteln.

E 600 Gebrauchslösung

Verdünnung der Stammlösung 1 : 5 mit aqua dest.

Serumverdünnung

Serum 1 : 5 mit 0,9 %iger NaCl verdünnt

Alle Lösungen wurden vor der Messung auf eine Temperatur von ca. 25° gebracht.

Meßansatz

In ein Reagenzglas wurden pipettiert:

3,3 ml Glycin - NaOH-Puffer mit EDTA

0,5 ml Serumverdünnung

1,0 ml E 600 Gebrauchslösung

Nach Durchmischung wurde daraus eine 1 cm Küvette gefüllt.

Messung

Die Küvette wird sofort in das Photometer verbracht, 30 und 180 Sekunden nach Erstellung des Ansatzes wird bei 405 nm die Extinktion des freiwerdenden p-Nitrophenols gemessen. Die Differenz der Extinktionen nach 180 sec. und 30 sec. gelangt zur Auswertung. Die Temperatur beträgt 25° C.

5. Berechnung

Anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol bei 405 nm (in Glycinpuffer, pH 11,2) von

$$18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

kann die Aktivität nach folgendem Ansatz berechnet werden:

$$\text{Aktivität A (in U/l Serum)} = \frac{E \times 10 \times 4,8 \times 10}{0,1805 \cdot 2,5}$$

In dieser Formel werden unter der Maßgabe, daß bei einem

$$\text{Extinktionskoeffizienten von } 18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

10 μ Mol p-Nitrophenol, gelöst in 1 ml, bei einer Schichthöhe von $d = 1$ cm, bei einer Wellenlänge von 405 nm eine Extinktion von 0,1805 hätten, folgende Faktoren berücksichtigt:

Die Serumverdünnung in Umrechnung auf 1 ml (Multiplikation mit 10)

die Meßzeit von 150 sec. in Umrechnung auf 1 Min.
(Division durch 2,5)

das Ansatzvolumen von 4,8 ml (Multiplikation mit 4,8)

VI. Ergebnisse

Die Paraoxon-spaltende Aktivität in Gegenwart von 10^{-3} M EDTA in den frisch gewonnenen Seren ($n=99$) zeigt Tab. 1; die der 20 Monate gelagerten Seren ($n=54$) zeigt Tab. 2.

Tab. 3 gibt die errechneten Korrelationskoeffizienten für die Korrelation zwischen Alter und Aktivität, sowie zwischen Ausgangsaktivität und nicht EDTA-hemmbarer Aktivität (= EDTA stabiler Aktivität) wieder, wobei Frauen und Männer gesondert betrachtet wurden.

Tab. 4 Seite 25

Tabelle 1

Nicht EDTA hemmbare Aktivität bei 99 Finnen (frische Seren)

Probanden- nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
		männl. = Y	
		weibl. = X	
1	36	Y	47
2	29	Y	44
3	23	Y	49
4	24	Y	47
5	49	X	45
6	54	X	33
7	39	X	32
8	23	Y	47
9	24	Y	37
10	25	X	41
11	55	Y	36
12	52	X	47
13	28	X	51
14	28	Y	47
15	26	Y	48
16	44	X	29
17	27	Y	45
18	23	Y	45
19	31	X	35
20	29	X	41

Probanden- nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/1
21	21	X	35
22	25	X	46
23	32	Y	35
24	37	X	41
25	33	Y	32
26	43	X	28
27	27	Y	37
28	28	Y	37
29	47	Y	34
30	33	X	52
31	28	X	54
32	33	X	39
33	29	X	29
34	24	X	37
35	31	X	55
36	25	X	37
37	26	X	43
38	57	X	30
39	23	Y	41
40	43	Y	45
41	47	X	33
42	21	X	51
43	43	X	49
44	21	X	52

Probanden nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
45	33	X	43
46	36	X	38
47	23	X	43
48	26	Y	43
49	31	Y	33
50	44	X	30
51	34	X	47
52	49	X	38
53	46	X	45
54	29	X	54
55	34	X	44
56	21	X	36
57	29	X	28
58	33	X	20
59	25	X	38
60	28	X	49
61	28	X	49
62	53	X	39
63	52	X	36
64	29	Y	37
65	30	Y	36
66	38	X	46
67	51	Y	39
68	25	X	45
69	43	Y	50
70	32	X	46

Probanden- nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
71	26	X	26
72	35	Y	47
73	31	X	24
74	27	X	49
75	25	X	24
76	27	X	23
77	25	Y	46
78	37	X	47
79	20	X	27
80	37	X	43
81	22	Y	45
82	18	Y	47
83	28	X	54
84	20	X	56
85	36	Y	4
86	29	X	49
87	45	Y	37
88	32	X	53
89	31	Y	41
90	28	X	47
91	39	X	44
92	44	X	41
93	36	X	38
94	22	Y	47

Probanden nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/1
95	54	X	47
96	40	X	45
97	49	X	49
98	24	X	41
99	42	X	51

Tabelle 2

Nicht EDTA hemmbare Aktivität bei 54 Finnen
(Seren ca. 20 Monate tiefgefroren)

Serum nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
		männl. = Y weibl. = X	
1	36	Y	29
2	48	Y	23
3	56	X	29
4	44	X	39
5	36	Y	29
6	51	Y	39
7	44	Y	26
8	50	X	38
9	34	Y	51
10	44	X	52
11	49	X	13
12	38	Y	49
13	42	Y	24
14	44	Y	26
15	30	X	34
16	32	X	29
17	36	Y	33
18	37	Y	34
19	24	Y	30

Serum nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/1
20	26	Y	46
21	52	Y	37
22	34	Y	26
23	32	X	27
24	26	X	26
25	26	X	40
26	39	X	22
27	42	X	34
28	31	X	42
29	29	Y	28
30	20	X	43
31	28	Y	32
32	22	X	24
33	32	Y	21
34	30	Y	42
35	38	Y	31
36	23	Y	27
37	34	Y	35
38	26	X	39
39	37	X	37
40	55	X	24
41	20	X	30
42	44	Y	31

Serum- nummer	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
43	52	X	23
44	27	Y	33
45	25	X	27
46	44	Y	19
47	34	Y	16
48	37	Y	25
49	22	X	34
50	21	Y	33
51	26	X	36
52	27	Y	26
53	55	X	22
54	34	X	32

Tabelle 3

Korrelationskoeffizienten für die Unterkollektive

1. Kollektiv der frischen Seren (n=99)

Alter - EDTA - stabile Aktivität

Frauen (n=67)	Männer (n=32)
$r = 0,0815$	$r = 0,2540$

Ausgangsaktivität - EDTA - stabile Aktivität

Frauen (n=67)	Männer (n=32)
$r = 0,1250$	$r = 0,2917$
Prüfgröße = - 0,19490 (Wilcoxon - Test)	

2. Kollektiv der gelagerten Seren (n=54)

Alter - EDTA - stabile Aktivität

Frauen (n=25)	Männer (n=29)
$r = 0,2739$	$r = 0,0915$

Ausgangsaktivität - EDTA - stabile Aktivität

Frauen (n=25)	Männer (n=29)
$r = 0,0908$	$r = 0,0060$
Prüfgröße = 0,56448	

VII. Stat. Auswertung der Ergebnisse

Erhebung, Erfassung und Auswertung der Daten

Alle Daten wurden, auf einem standardisierten Datenerhebungsbogen erfaßt. Sie wurden dann auf Lochkarten übertragen und in den Siemens Computer 7738 bzw. 7541 des medizinischen Fachbereichsrechners der Universität Erlangen- Nürnberg eingelesen.

Mit Hilfe des Programmpaketes STAISYS (Victor et al. 1973) wurden die Daten ausgewertet. Dabei wurde auf folgende Unterprogramme zurückgegriffen:

- P 020: Berechnung von Mittelwert, Minimum und Maximum, Fallzahl, Standardabweichung und Schiefe der Verteilung der Parameter, Alter und EDTA - stabile Paraoxonaseaktivität, sowohl für das Gesamtkollektiv, als auch für Männer und Frauen getrennt.
- P 022: Berechnung der Klassenhäufigkeiten in Tabellenform und Erstellung von Histogrammen, in die das Alter und die Aktivität sowohl des Gesamtkollektivs, als auch der Kollektive der Frauen und Männer Eingang fanden.
- P 030: Berechnung der linearen Regressions- und Korrelationskoeffizienten zwischen Alter und Aktivität für die untersuchten Kollektive der Männer und Frauen, sowie für das Gesamtkollektiv. Zusätzlich führte das Programm einen Test für den jeweiligen Korrelationskoeffizienten r durch.

Die Korrelationsdiagramme für Männer, Frauen und Gesamtkollektive wurden mit Hilfe des PLOT - Programmes (Hommel 1978) erstellt.

- P 100: Durchführung des Wilcoxon Tests für unverbundene Stichproben, mit dessen Hilfe nachgeprüft werden kann, ob zwei Stichproben der gleichen Grundeinheit entstammen.

Nullhypothese:

$$H_0 : F_1(x) = F_2(y)$$

wobei $F_1(x)$ die Aktivitätsverteilung der Männer
 $F_2(y)$ die der Frauen darstellt.

Für den Fall, daß der Umfang der beiden Stichproben
 $n_1 + n_2 = 50$, würde eine korrigierte Testgröße eingeführt.
 Sie beträgt 1,96 bei einem Signifikanzniveau von - 5 %.

Ist nun der Absolutwert der ermittelten Prüfgröße kleiner
 als der kritische Wert von 1,96, so kann die Nullhypothese
 nicht abgelehnt werden, man kann also nicht verneinen, daß
 die Verteilung der Männer und Frauen bezüglich der Variab-
 len "EDIA stabile Aktivität" gleich ist.

Falls der Absolutwert der Prüfgröße größer ist als der
 kritische Wert von 1,96, muß die Nullhypothese abgelehnt
 werden.

VIII. Diskussion der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Omuro (1980) und Hieronymus (1980) zeigt die Aktivität der EDTA-stabilen Paraoxonase einen von der ungehemmten Aktivität abweichenden Verlauf. Die Trimodalität der Aktivitätsverteilung in den frisch abgenommenen Seren ($n=99$), wie Koller (1982) sie für den EDTA-freien Ansatz zeigen konnte, wich einer Verteilung, die, mit Vorbehalten, als einer Normalverteilung ähnlich erachtet werden kann. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Omuro (1980) und Hieronymus (1980).

Die Gruppe der 20 Monate bei -22°C gelagerten Seren ließ ohne EDTA-Hemmung keine Trimodalität erkennen; dies entspricht der Feststellung von Lindorf (1971), der nach mehr als dreimonatiger Tiefkühlagerung ein "Verwischen" der Trimodalität beobachtete. Nach EDTA-Hemmung ergaben diese Seren in ihrer graphischen Darstellung einen der Normalverteilung durchaus ähnlichen Kurvenverlauf, wie Omuro und Hieronymus (bd. 1980) ihn für frische Seren angaben.

Dies läßt sich einfügen in die Beobachtungen von Skrinjaric-Spoljar (1968) sowie von Erdös und Boggs (1961) die von mehr als einem Enzym ausgingen, das die Paraoxonhydrolyse vermittelt. Hechtel (1980) sah unter steigenden Konzentrationen von EDTA im enzym-kinetischen Ansatz die Trimodalität schließlich aufgehoben.

Wie aus den Abb. 9, 10, 11 und 12 zu ersehen ist, liegen die Mittelwerte der nicht mehr EDTA-hemmbar spaltenden Aktivität in den untersuchten Seren offensichtlich niedriger als die der nicht EDTA-gehemmten Vergleichsproben.

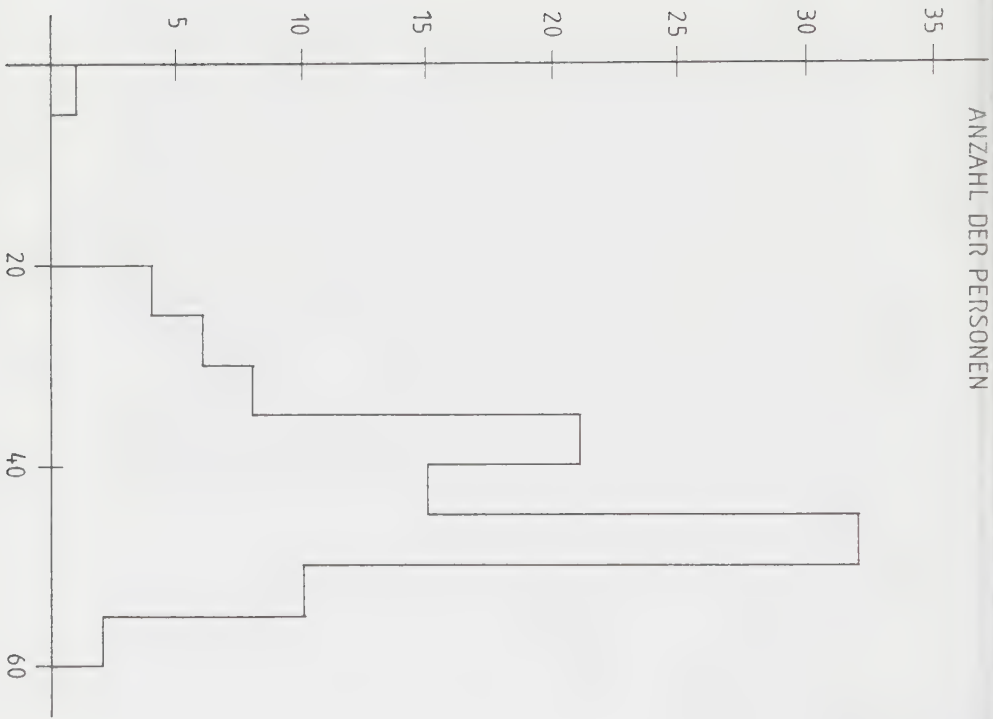
Für beide Kollektive ließ sich ein Zusammenhang zwischen Alter und EDTA-stabiler Aktivität anhand der ermittelten Korrelationskoeffizienten, die sämtlich von 0 verschieden sind, ausschließen, und zwar für die jeweiligen Unterkollektive von Männern und Frauen. Eine Abhängigkeit der EDTA-stabilen Aktivität von der Ausgangsaktivität war gleichfalls nicht zu belegen. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verneinte die Frage nach einer geschlechtsspezifischen Aktivitätsverteilung; eine geschlechts-

spezifische Altersverteilung war zuvor ausgeschlossen worden.

Die fehlende Abhängigkeit der nicht EDTA-hemmbar Aktivität von der Ausgangsaktivität läßt vermuten, daß sie Ausdruck eines eigenen Enzymsystems ist, das im Rahmen der Serum-Para-oxonase als unabhängig und eigenständig betrachtet werden muß. Sie wurde daher als EDTA-stabil bezeichnet. Offensichtlich umfaßt die Gesamtaktivität zwei isolierte Enzymsysteme, von denen eines sich durch EDTA in der verwendeten Konzentration von 10^{-3} M vollständig hemmen läßt, das andere sich davon als unabhängig erweist. Dies würde auch eine Erklärung abgeben für die Ergebnisse von Hechtel (1980).

Hinsichtlich der genetischen Determination kann für die EDTA-stabile Aktivität der Paraoxonhydrolyse ein anders gearteter Mechanismus angenommen werden, als er für die Gesamt-Paraoxonase beschrieben wurde.

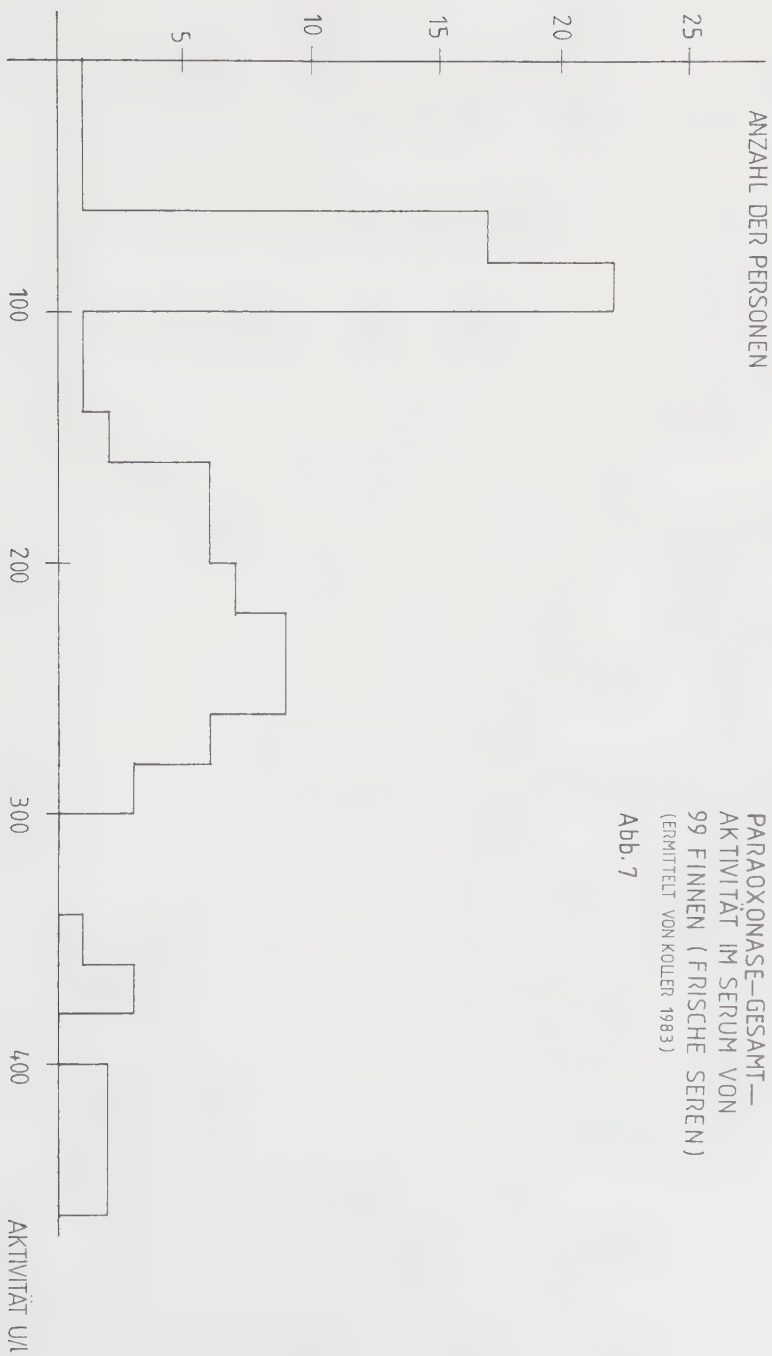
ANZAHL DER PERSONEN



NICHT EDTA - HEMMBARE PARAOXON
SPALTENDE AKTIVITÄT IM SERUM
VON 99 FINNEN

Abb. 6

AKTIVITÄT U/I



PARAOXONASE-GESAMT-
AKTIVITÄT IM SERUM VON
99 FINNEN (FRISCHE SEREN)
(ERMITTELT VON KOLLER 1983)

Abb. 7



PAIROXONASE-GESAMT-
 AKTIVITÄT IM JAHR VON
 54 FIRMEN (ZUM DATUM 31.12.2001)

Abb. 2

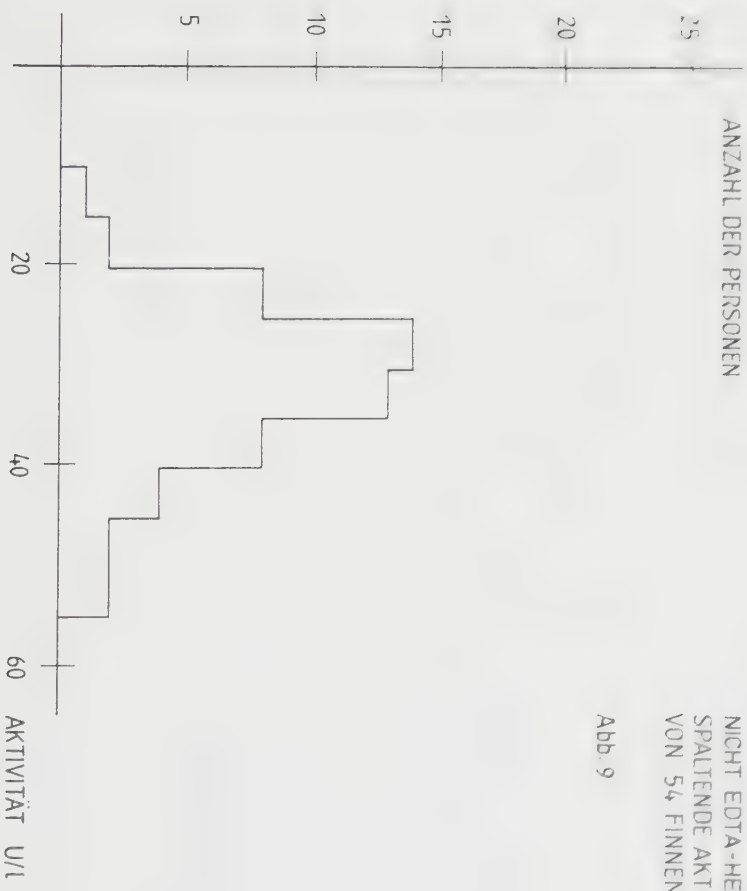
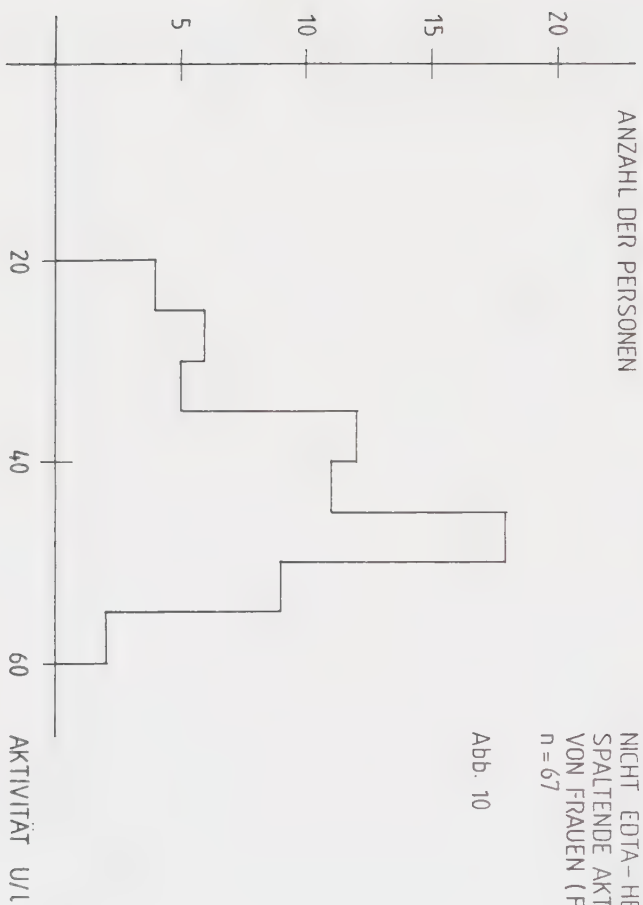


Abb. 9



NICHT EDTA-HEMMBARE PARAOXON
SPALTENDE AKTIVITÄT IM SERUM
VON FRAUEN (FRISCHE SEREN)
 $n = 67$

Abb. 10

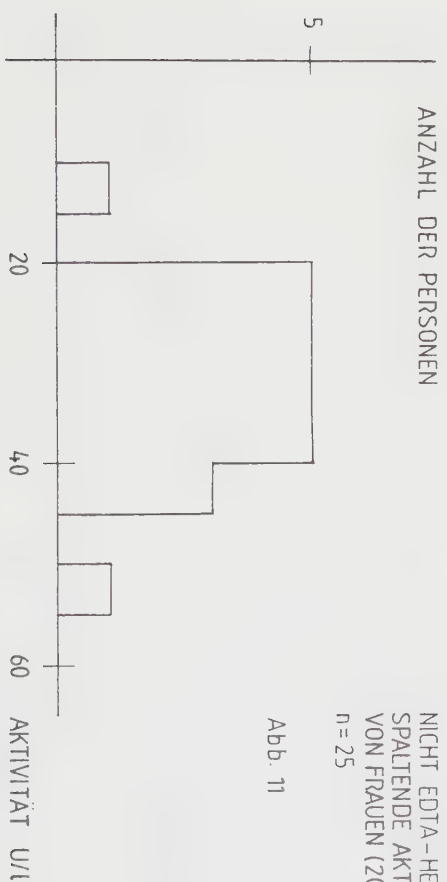
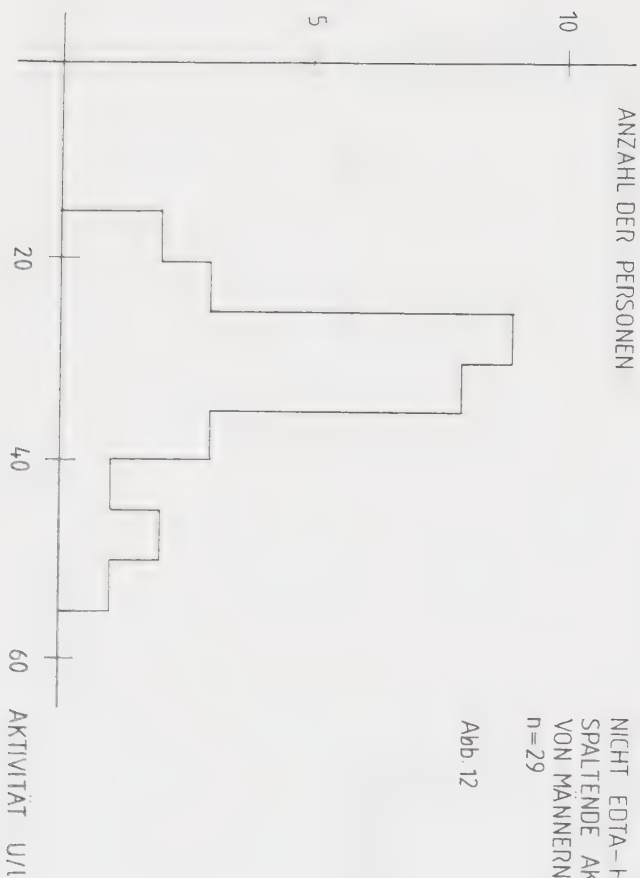
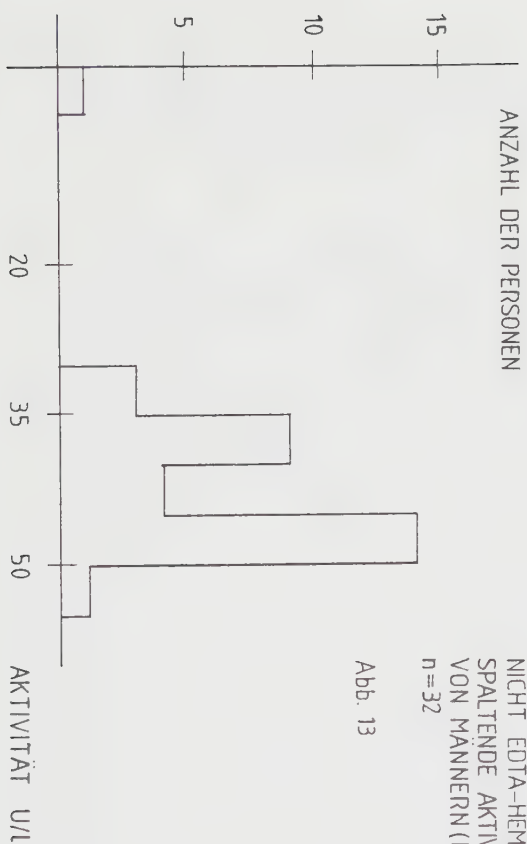


Abb. 11
NICHT EDTA-HEMMBARE PARAOXON
SPALTENDE AKTIVITÄT IM SERUM
VON FRAUEN (20 MONATE ALTE SEREN)
n = 25



NICHT EDTA-HEMMBARE PARAOXON
SPALTENDE AKTIVITÄT IM SERUM
VON MÄNNERN (20 MONATE ALTE SEREN)
n = 29

Abb. 12



NICHT EDTA-HEMMBARE PARAOXON
SPALTENDE AKTIVITÄT IM SERUM
VON MÄNNERN (FRISCHE SEREN)
n = 32

Abb. 13

IX. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde anhand zweier finnischer Kollektive das Aktivitätsverhalten der EDTA-stabilen Serumparaoxonase überprüft, deren Aktivität nach Hemmung der Serumparaoxonasen durch Zusatz von EDTA in einer Konzentration von 10^{-3} m im Ansatz nach Krisch ermittelt wurde.

Für beide Kollektive ließ sich kein Einfluß von Alter und Geschlecht auf das Aktivitätsmuster nachweisen. Auch zeigte sich die EDTA-stabile Paraoxonase in ihrem Aktivitätsverhalten unbeeinflusst von der Ausgangsaktivität der ungehemmten Paraoxonase, so daß der Schluß naheliegt, die EDTA-stabile Paraoxonase bilde ein eigenes Enzymsystem. Die graph. Darstellung der Aktivität ähnelt, wie bereits in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt, einer Normalverteilung. Wie die ungehemmte Paraoxonase unterliegt auch die EDTA-stabile Paraoxonase einem Aktivitätsverlust durch längere Lagerung (in diesem Falle 20 Monate bei -22°).

1. Literaturverzeichnis:

Aldrige, W. N.:

Serumesterases. 1. Two types of esterases(A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method für their determination.
Biochem. J. 53. 110 (1953 a)

Aldrige, W. N.:

Serumesterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-Esterases of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

Bernatzki, H.:

Neue große Völkerkunde
Herkules Corporation
Frankfurt 1954

Dumbach, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (E.C.3.1.1.2.)
Dissertation Erlangen 1976

Eickstedt von, E.:

Rassenkunde und Rassengeschichte der Menschheit
Enke, Stuttgart 1934

Erdös, E. G., C. R. Debay, M.P. Westermann

Activitation and inhibition of the arylesterase of human serum
Nature 184, 430 (1959)

Erdös, E. G., L. E. Boggs:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood
Nature 190, 716 (1961)

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., H. Rabost, H. Lindorf
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O- (p-nitrophenyl)-phosphat).
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M., W. Baumgartner,
M. Petenyi, H. Burgis, H. H. Lindorf, H. Metzner:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbar-
keit der Serumcholinesterase durch E 600 und der
Aktivität des E 600 spaltenden Enzymsystems in mensch-
lichen Seren.

Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M., H. H. Lindorf, M. Peteny,
M. Flügel, Th. Fischer, Th. Hiller:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).

Humangenetik 17, 331 (1973 a)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M. M. Peteny, H. Metzner,
H. Burgis, B. Dietzel, H. Nirschl, O. Renner:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 b)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M. G. Hommel, J. Dumbach:
On the genetics of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2.)
Humangenetik 50, 313 (1979)

Hechtel, R.:

Die Hemmung der menschlichen Serum-Paraoxonase durch EDTA
Dissertation Erlangen 1980

Hommel, G.:

PL01: Computerprogramm zur Darstellung von Korrelations-
diagrammen

Erlangen 1976

Jutikkula, E.:

Geschichte Finnlands

Kröner, Stuttgart 1976

Krisch, K:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat
durch menschliches Serum

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

Koller, A.:

Untersuchung zur Aktivitätsverteilung
Paraoxon spaltender Enzyme bei Finnen
Dissertation Erlangen 1983

Marton, A. V., W. Kalow:

Inhibitors of aromatic esterase of human serum
Biochem. Pharmacol. 3, 149 (1960)

Menzel, W.:

Die Serumarylesterasen (EC 3.1.1.2.) in der Literatur
von 1941 - 1971
Dissertation Erlangen 1978

Main, A. R.:

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-
p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum
Biochem. H. 74, 10 (1960 a)

Main, A. R.:

The differentiation of the A-type esterases in sheep
serum
Biochem. J. 75, 188 (1960 b)

Neal, R. A.:

Enzymic mechanism of metabolism of the phosphoro-thioate
insecticides
Arch. intern. Med. 128, 118 (1971)

Omuro, O.:

Serum-Paraoxonase-Polymorphismus in Japan
Dissertation Erlangen 1980

Playfer, J. R., L. C. Eze, M. F. Bullen, D. A. P. Evans:
Genetic polymorphism and interethnic variability of
plasma paraoxonase activity
J. Med. Gen. 13, 337 (1976)

Rege, P. L., W. A. Scott:

Evidence for extrahepatic metabolism of parathion
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 759 (1972)

Skrinjaric-Spoljar, M. I. Reiner:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylphosphate by human sera

Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

Zech, R., K. Zürcher

Organophosphate splitting serum enzymes in different
mammals

Comp. Biochem. Physiol. (B. 48, 427 1974

Victor, N.; Hörmann A.; Eder, L.:

STATSYS - Beschreibung und Benutzeranleitung-
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
München 1973

Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Kahlevi vom anatom. Institut der Universität Oulu und seinen Mitarbeitern für die freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Darüberhinaus Frau Prof. Geldmacher v. Malinckrodt für die Betreuung der Arbeit, sowie auch Herrn Diepgen und Herrn Dome für die stat. Auswertung.

Lebenslauf

geboren am 2.3.1948 in Bad Kissingen als Sohn des Kaufmannes Wilhelm Brensing und seiner Ehefrau Erna

- 1954 - 1959 Besuch der St.-Anna-Volksschule in München
- 1959 Übertritt ins Rupprecht-Gymnasium in München
- 1968 Abitur
 daran anschließend Praktikum für das Studium
 der Garten- und Landschaftsgestaltung
- 1969 Beginn des Medizinstudiums in Erlangen
- 1972 Physikum
- 1976 Staatsexamen in Erlangen

Seit 1976 Assistent am Kreiskrankenhaus Neumarkt, bis zur Approbation 1977 als Medizinalassistent, dann drei Jahre als Assistenzarzt der Chirurgie und ein Jahr der Anästhesie. Nach weiteren eineinhalb Jahren Assistenzzeit auf der Inneren Abteilung und halbjähriger Pflichtweiterbildung in einer großen Landpraxis seit Februar 1983 Niederlassung als Arzt für Allgemeinmedizin in Flossenbürg.

